

(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) EP 0 723 017 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
24.07.1996 Patentblatt 1996/30

(51) Int. Cl.⁶: C12N 15/54, C12N 9/10,
C12Q 1/48, A01N 3/00,
C12N 1/21, C12N 5/10

(21) Anmeldenummer: 96100458.7

(22) Anmeldetag: 13.01.1996

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL

(30) Priorität: 23.01.1995 DE 19501906

(71) Anmelder: BASF AKTIENGESELLSCHAFT
67056 Ludwigshafen (DE)

(72) Erfinder:
• Schmidt, Ralf-Michael, Dr.
D-67434 Neustadt (DE)
• Stitt, Marc, Prof. Dr.
D-69221 Dossenheim (DE)
• Sonnewald, Uwe, Dr.
D-06467 Hoym (DE)

(54) Transketolase

(57) Protein mit Transketolase Aktivität, enthaltend
eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von
mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 dar-
stellt, sowie für dieses Protein kodierende Nukleinsäu-
ren und seine Verwendung.

EP 0 723 017 A2

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine mit Transketolase Aktivität, ihre Verwendung in Testsystemen, sowie Nukleinsäuren, die für diese Proteine codieren.

5 Pflanzen sind in der Lage, unter Verwendung von Lichtenergie aus atmosphärischem Kohlendioxid organische Verbindungen unter Sauerstoffbildung aufzubauen. Dieser Vorgang wird als Photosynthese bezeichnet.

Es ist anzunehmen, daß die effiziente Bildung, Nutzung und Verteilung der Photosyntheseprodukte das Wachstum einer Pflanze stark beeinflussen.

10 Da Pflanzen auf eine funktionierende Photosynthese angewiesen sind und vergleichbare Reaktionen in tierischen Organismen nicht vorkommen, bietet sich der Photosyntheseapparat als ideales Ziel für den Einsatz von Herbiziden an.

Die komplexen Reaktionen, die zur Kohlendioxidfixierung führen unterteilt man in Licht- und Dunkelreaktion. Die Lichtreaktion dient der Bereitstellung von Energie in Form von ATP und von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH. In der Dunkelreaktion (reduktiver Pentosephosphatzzyklus oder Calvin Zyklus) werden diese Verbindungen zur Synthese organischer Kohlenstoffverbindungen genutzt.

15 Einige der bekannten Herbizide (z.B. Dichlorphenylmethylharnstoff oder Paraquat) wirken durch eine Inhibierung der Lichtreaktion. Die Dunkelreaktion wird als Angriffspunkt für Herbizide nicht genutzt.

Die Enzymreaktionen des reduktiven Pentosephosphatzzyklus werden in drei Abschnitte unterteilt:

20 a) Carboxylierung
b) Reduktion
c) Regenerierung.

Bei der Carboxylierung reagiert Kohlendioxid mit dem Akzeptormolekül Ribulose-Bisphosphat (RuBP), wodurch zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat

25 (3-PGA) gebildet werden. Anschließend wird 3-PGA nach Phosphorylierung zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) reduziert. In der Regenerationsphase wird das Akzeptormolekül RuBP aus dem entstandenen GAP resynthetisiert. Von sechs gebildeten Molekülen GAP kann ein Molekül für andere Stoffwechselwege eingesetzt werden.

30 Eine Vielzahl der am reduktiven Pentosephosphatzzyklus beteiligten Enzyme stellen potentielle Angriffspunkte für Herbizide dar. Eine besondere Stellung nimmt allerdings die plastidäre Transketolase ein. Wie die Transaldolase katalysiert die Transketolase (E.C. 2.2.1.1.) zwei Reaktionen:

(1)



(2)



40 Die an den Reaktionen beteiligten Substrate und Produkte stellen Verknüpfungspunkte des reduktiven Pentosephosphatzzyklus mit anderen Stoffwechselwegen dar. Exportierte Triosephosphate dienen im Zytosol als Substrate für Glykolyse und Gluconeogenese. Fruktose-6-Phosphat wird als Vorläufermolekül zur Herstellung von Stärke in den Plastiden genutzt. Erythrose-4-Phosphat ist ein Mittler zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel. Verknüpft mit Phosphoenolpyruvat mündet Erythrose-4-Phosphat in den Shikimat-Weg, der zur Synthese aromatischer Aminosäuren und phenolischer Substanzen führt.

45 Ribose-5-Phosphat wird in unterschiedlichen Stoffwechselwegen als Substrat verwendet.

In pflanzlichen Geweben wurden zwei Transketolase-Isoformen beschrieben, die sich in ihrer subzellulären Kompartimentierung unterscheiden (Murphy and Walker, 1982, Planta 155, 316-320).

50 Die plastidäre Transketolase ist in grünen Geweben für mehr als 75% der Gesamtaktivität verantwortlich. Das aktive Enzym liegt als Homotetramer (Holoenzym) mit einer relativen Molekulargmasse von 150 kDa vor. Als Cofaktoren benötigt die Transketolase Vitamin B1 (Thiaminpyrophosphat) und Magnesium. In Abwesenheit von Thiaminpyrophosphat oder in Anwesenheit von Mercaptoethanol zerfällt das Tetramer in zwei Dimere (Apoenzyme) mit einer relativen Molekulargmasse von je 74 kDa. Holo- und Apoenzym sind katalytisch aktiv, wobei das Holoenzym eine wesentlich höhere Aktivität als das Apoenzym aufweist.

55 Gene, die für Transketolase kodieren, wurden bisher aus *Saccharomyces cerevisiae* (Flechter et al., Biochemistry 31, 1892-1896, 1993; Sundström et al., J. Biol. Chem. 268, 24346-24352, 1993; Schaff-Gerstenschläger et al., Eur. J. Biochem. 217, 487-492, 1993), aus *Hansenula polymorpha* (Janowicz et al., Nucl. Acids Res. 13, 3043-3062, 1985), menschlichen Erythrozyten (Abedinia et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 183, 1159-1166, 1992; McCool et al., J. Biol. Chem. 268, 1397-1404, 1993), *Rhodobacter sphaeroides* (Chen et al., J. Biol. Chem. 266, 20447-20452, 1992)

und *Escherichia coli* (Sprenger, Biochem. Biophys. Acta 1216, 307-310, 1992; Tida et al., J. Bacteriol. 175, 5375-5383, 1993) isoliert und beschrieben. Gene pflanzlicher Transketolasen sind bisher nicht bekannt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, eine pflanzliche Transketolase in reiner Form durch Klonierung des entsprechenden Gens zur Verfügung zu stellen.

5 Demgemäß wurde ein Protein mit Transketolase Aktivität, enthaltend die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz, gefunden.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz beruht auf der Translation der in SEQ ID NO 1 dargestellten cDNA Sequenz.

Das in SEQ ID NO 2 dargestellte Protein ist ein sogenanntes Vorläuferprotein bestehend aus 743 Aminosäuren.

10 Das reife Protein ist aus der Vorläuferform durch Abspalten des chloroplastidären Transitpeptides, das gemäß einer Computeranalyse aus den N-terminalen 77 Aminosäuren besteht, erhältlich.

Sowohl das Vorläuferprotein, als auch durch Substitution, Deletion oder Insertion von Aminosäuren davon abgeleitete Proteine, die noch über eine Transketolase-Aktivität verfügen, gehören zu den erfindungsgemäßen Proteinen.

15 Unter Substitution ist der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere andere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Val durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung; bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

20 Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch eine oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Besonders bevorzugt sind Proteine, die durch N-terminale Verkürzungen um 20 bis 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 entstehen.

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuren, die für die oben genannten Proteine kodieren. Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich. Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus spezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

30 Soll die pflanzliche Transketolase beispielsweise in einem Bakterium exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage des Bakteriums bei der Rückübersetzung zu verwenden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Vektoren, die die für die erfindungsgemäße Transketolase kodierenden Nukleinsäuren zusammen mit funktionellen Regulationssignalen enthalten.

Darunter sind beispielsweise Signale für Transkription und Translation wie Promotoren und Ribosomenbindungsstellen oder für Replikation oder Integration notwendige Sequenzen zu verstehen.

35 Die erfindungsgemäßen Proteine eignen sich besonders zur Identifizierung von herbiziden Wirkstoffen, insbesondere zur Auffindung von Transketolase spezifischen Hemmstoffen.

Dazu können die Proteine beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der Transketolase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen lässt sich eine qualitative und quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen.

40 Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Herbizide, die mit einem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

45 Die Erfindung besteht außerdem in einem Verfahren zur Herstellung von Herbiziden, die eine pflanzliche Transketolase inhibieren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man bekannte chemische Verbindungen in einem oben beschriebenen Testverfahren überprüft und solche mit inhibierender Wirkung mit üblichen Träger- und Hilfsstoffen als Herbizid formuliert.

50 Daß die Transketolase inhibierende Eigenschaft einer Substanz allein nicht ausreicht für die Eignung als Herbizid, sondern noch weitere Prüfungen durchzuführen sind, ist jedem Fachmann geläufig.

Das Verfahren gestattet es jedoch reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter veranschaulicht.

Beispiele

A. Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen B zugrundeliegen:

5 1. Allgemeine Klonierungsverfahren

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspalungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt. Transformation und Anzucht von *Pichia pastoris* wurde entsprechend den Angaben der Vertreiberfirma (Invitrogen Corporation) durchgeführt. Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurde entsprechend der Methode von Höfgen und Willmitzer (Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877) ausgeführt. Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte in YEB Medium (Vervliet et al. J. Gen. Virol. (1975) 26, 33).

15 2. Erzeugung von cDNA-Bibliotheken

Zur Herstellung von Blatt-spezifischen cDNA Bibliotheken wurde Gesamt-RNA aus Tabakblättern nach einer von Logemann et al. (Anal. Biochem. (1987) 163,21) beschriebenen Methode isoliert. Anschließend wurde die poly(A)-RNA über Oligo(dT)-Cellulose Type 7 (Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden 5 µg der so erhaltenen RNA für die cDNA Synthese eingesetzt. Alle für die Herstellung der cDNA notwendigen Chemikalien und Enzyme wurden durch die Firma Stratagene (La Jolla CA 92037, USA) bezogen. Die angewandten Methoden wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Synthese des ersten und zweiten Stranges der cDNA wurde mit dem ZAP-cDNA Synthese Kit durchgeführt. Die erhaltenen doppelsträngigen cDNAs wurden anschließend mit EcoRI-NotI Adaptoren versehen und in einen EcoRI gespaltenen Lambda ZapII Vektor kloniert. Nach in vitro Verpackung (Gigapack II Verpackungsextrakt) der rekombinanten Lambda DNA wurden XL-1 *E. coli* Zellen (Stratagene) transformiert. Durch Auszählen der gebildeten Plaques wurde der Titer der cDNA-Bibliotheken bestimmt.

30 3. Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek mittels heterologer DNA-Sonden

2 x 10⁵ rekombinante Lambda Phagen (Lambda ZapII) einer blattspezifische cDNA-Bibliothek aus Tabak (Varietät Samsun NN) wurden auf Agarplatten ausplattiert. Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) auf Nylon-Membranen (Hybond N, Amersham Buchler) transferiert und durch Inkubation für 2 Stunden bei 80°C auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungssonden dienten DNA-Fragmente, die mit Hilfe eines "Multiprime DNA labelling systems" (Amersham Buchler) in Anwesenheit von α -³²P-dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert wurden. Hybridisierung der Membran erfolgte nach Prähybridisierung bei 42°C in PEG-Puffer (Amasino (1986) Anal. Biochem. 152, 304-307) für 12-16 Stunden. Anschließend wurden die Filter 3 x 20 Minuten in 2 x SSC, 0,1 % SDS bei 42°C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und durch Standardtechniken gereinigt.

40 4. Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem automatischen Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzer (A.L.F.) der Firma Pharmacia unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Oligonukleotide nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467).

45 5. Bakterienstämme und Hefestämme

E. coli (XL-1 Blue) Bakterien wurden von der Firma Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation eingesetzte *Agrobacterium tumefaciens* Stamm (C58Cl mit dem Plasmid pGV 3850kan) wurde von Debleare et al. (1985, Nucl. Acid Res. 13, 4777) beschrieben. *Pichia pastoris* Stamm GS115 wurde von der Firma Invitrogen Corporation (San Diego, CA 92121, USA) bezogen.

50 6. Tabaktransformation

Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN) wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtkultur von *Agrobacterium tumefaciens* abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Bakterien im gleichen Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakterienlösung gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant. (1962) 15,473) mit 2 % Saccharose und 0,8 % Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100 mg/l Kanamycin, 500 mg/l Clorotan, 1 mg/ml Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphthylessigsäure (NAA), 1,6 % Glukose und 0,8 % Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht/8 Stunden

Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Cloran und 0,8 % Bacto-Agar überführt.

7. Analyse von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben

5 Gesamt RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann et al. (Anal. Biochem. (1987) 163,21) beschrieben isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 20-40 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt. Nach elektrophoretischer Auf trennung der RNA Moleküle wurde die RNA mittels Kapillartransfer auf eine Nylon Membran übertragen. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei Amasino (Anal. Biochem. (1986) 152, 304) beschrieben durchgeführt. Die als Sonde eingesetzten cDNA-Fragmente wurden mit einem Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim) radioaktiv markiert.

8. PCR-Amplifikation von Nukleinsäuren

10 Die PCR-Amplifikation der Transketolase zur Expression des Enzyms in *E. coli* und *Pichia* wurde in einem DNA-Thermal Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Reaktionsgemische enthielten 1 ng Template, 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 0,25 mM Nukleotide (Pharmacia), Amplifikationspuffer (16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25°C), 0,01 % Tween 20, 7,5 mM MgCl₂) und 2,5 Einheiten der Tth DNA Polymerase (Biomaster, Crottendorfer Str. 25, 51109 Köln). Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

15 Anlagerungstemperatur: 60°C
Denaturierungstemperatur: 94°C
Elongationstemperatur: 72°C
Anzahl der Zyklen: 30

20 9. Überexpression von Proteinen in *E. coli*

25 Zur Überexpression der Transketolase in *E. coli* wurden 2 ml einer bei 28°C angezogenen Übernacht kultur in 20 ml Wachstumsmedium (LB-Medium komplettiert mit 10 µg/ml Tetracyclin, 200 µg/ml Ampicillin, 1 mM Vitamin B1, 1 mM MgSO₄) überführt. Das Wachstum erfolgte bei 28°C unter Schütteln. Nach 3 Stunden wurde die Expression der Transketolase durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Der Nachweis des produzierten Proteins wurde durch Auf trennung der Proteine in einem SDS-PAGE (Laemmli (1970) Nature 227, 680-685) mit anschließender Coomassie-Färbung der Proteine durchgeführt.

30 B. Ausführungsbeispiele

35 1. Klonierung der plastidären Transketolase

Aus einer blattspezifischen cDNA-Bibliothek aus Tabak (Varietät Samsun NN) wurde ein Klon, der für Transketolase kodiert, ausgewählt. Die DNA Sequenz ist in SEQ ID NO 1 dargestellt.
Der 2629 Basenpaar lange cDNA-Klon 21 enthält einen offenen Leseraster von 2229 Basen und kodiert für ein Protein mit 743 Aminosäuren. Analyse des Polypeptides unter Verwendung des Sequenzprogramms PC/Gene (Untermenü TRANSPEP) ergab, daß am N-Terminus des Proteins ein chloroplastidäres Transitpeptid von vermutlich 77 Aminosäuren vorhanden ist.

40 2. Vergleich der plastidären Transketolase aus Tabak mit bekannten Transketolase Proteinsequenzen

45 Homologievergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Klons TK-23 (MacMolly Sequenzanalyse Programm von Macintosh) mit publizierten Transketolase-Sequenzen ergaben, daß im Bereich des vermutlich reifen Polypeptides (Aminosäure 78 bis 743) die höchsten Homologien zu Transketolasen aus *Saccharomyces cerevisiae* bestehen (Abbildung 4). Die Sequenz des reifen Proteins (bestimmt durch Computervorhersage) ist zu 47,7 % bzw. 44,1 % identisch mit der Transketolase 1 bzw. 2 Sequenz aus *Saccharomyces cerevisiae*. Geringere Sequenzhomologien wurden zu den übrigen Transketolasen gefunden. Keine Sequenzhomologie wurde für den Bereich des Transitpeptides ermittelt.

50 3. Expressionsanalyse der plastidären Transketolase

55 Expressionsanalysen einiger am Calvin Cyclus beteiligter Enzyme (RUBISCO, FBPase) haben ergeben, daß die Akkumulation der entsprechenden Transkripte an grünes Gewebe und Licht gebunden ist. Zur Überprüfung der gewebespezifischen Expression der Transketolase in Tabakpflanzen wurde Gesamt-RNA aus Sinkblättern, Sourceblättern, Blütenknospen, Stengeln (Internodien, Nodien und Mark), Wurzeln und geöffneten Blüten wachsender Tabakpflanzen isoliert. Nach Auf trennung in Agarosegelen und Bindung der RNA auf Nylonmembranen wurde die Anwesenheit Transketolase spezifischer Transkripte durch Hybridisierung mit der radioaktiven TK-23 cDNA nachgewiesen. Wie in Abbildung 5 dargestellt, sind Transketolase-spezifische Transkripte in allen getesteten

Organen nachweisbar. Dieser Befund verdeutlicht, daß im Gegensatz zu anderen Enzymen des Calvin Cyclus, die Transketolase neben ihrer Funktion im Calvin Cyclus weitere Aufgaben im pflanzlichen Stoffwechsel erfüllt.

4. Antisenseinhibition der Transketolase in transgenen Tabakpflanzen

Um transgene Tabakpflanzen mit verminderter Transketolaseaktivität zu erzeugen, wurden die cDNA Klone TK-26 und TK-28 in Gegensinnrichtung mit einem konstitutiven Expression bewirkenden Promotor sowie einem pflanzlichen Terminationssignal versehen. Die Plasmide BinAR-anti-TK-26 und BinAR-anti-TK-28 bestehend aus den drei Fragmenten A, der jeweiligen cDNA (s. Abb. 6, TK-26 und TK-28) und C wurden durch Insertion der entsprechenden cDNA Sequenzen in den Expressionsvektor pBinAR (Abb. 7A) erzeugt.

Das Fragment A beinhaltet den 35S CaMV Promoter. Es enthält ein Fragment, welches die Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik Virus (CaMV) umfaßt (Franck et al. (1980) Cell 21, 285). Es wurde als EcoRI-KpnI Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al. (1986) Nucleic. Acid Res. 14, 5857) isoliert. Die TK-26 cDNA wurde aus dem pBluescript SK- (Abb. 6) als XbaI-Sall Fragment und die TK-28 cDNA als BamHI Fragment in Gegensinnrichtung in den pBinAR Vektor kloniert (Abb. 7B und C). Das Fragment C enthält das Polyadenylierungs-signal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984); EMBO J. 3, 835), Nukleotide 11749-11939, welches als Pvull-HindIII Fragment aus dem Plasmid pAGV 40 (Herrera-Estrella et al. (1983); Nature 303,209) isoliert worden ist und nach Addition von SphI-Linkern an die Pvull-Schnittstelle zwischen die SpHI-Hin-dIII Schnittstelle des Vektors kloniert worden war.

Die erhaltenen Plasmide wurden mit Hilfe des Agrobacteriumsystem in Tabak transformiert. Transformierte Tabak-pflanzen wurden auf Antibiotika haltigem Medium angezogen und die erfolgreiche Inhibition der Transketolase wurde durch Bestimmung der Transkriptmenge mittels Northern Experimenten ermittelt. Für jede Transformation (TK-26 und TK-28) wurden 100 unabhängige Transformanden untersucht. In Abbildung 8 ist das Ergebnis eines Northern-Experimentes dargestellt. In den meisten regenerierten Pflanzen konnte keine Reduktion der Transketolase mRNA nachgewiesen werden. Einige der Pflanzen zeigten allerdings eine starke Verminderung der Transketolase-spezifischen Transkripte (z.B. anti-TK-26 No. 26; Abb. 8). Die Reduktion der Transkriptmenge führte zu einer Unterdrückung des Pflanzenwachstums. Transfer der Pflanzen ins Gewächshaus führte zu einem Absterben der inhibierten Pflanzen.

5. Herstellung des Plasmides TK23-AC-pQE-9

Zur Etablierung eines molekularen Testsystems wurde die pflanzliche Transketolase in mikrobiellen Systemen überexprimiert.

Zur Expression der Transketolase in E. coli wurde die TK-23 Sequenz, die für das reife Polypeptid kodiert, unter Verwendung der Primer A und C (s. Abb. 9) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert (Gentechnische Verfahren, Absatz 8). Das TK23-AC PCR-Amplifikationsprodukt wurde anschließend als Sall Fragment in die Sall-Schnittstelle des Vektors PQE-9 (DIAGEN GmbH, QLAGEN Inc.) kloniert (Abb. 10).

6. Herstellung des Plasmides TK23-AC-pPIC-9 und TK23-BC-pHIL-D2

Da eukaryotische Enzyme häufig nur unzureichend in bakteriellen Systemen exprimiert werden können, wurden zwei weitere Plasmidkonstruktionen durchgeführt, die eine Expression in Pichia pastoris (Stamm GS115; Firma Invitrogen Corporation San Diego, CA 92121, USA) ermöglichen.

Zur Sekretion des Transketolase Proteins wurde das Plasmid TK23-AC-pPIC-9 konstruiert. Zur Fusion des Transketolase Proteins mit einem Hefe Signalpeptid wurde ein Teil der TK-23 Sequenz, der für das reife Polypeptid kodiert, unter Verwendung der Primer A und C (s. Abb. 9) amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert (Gentechnische Verfahren, Absatz 8). Das TK23-AC PCR-Amplifikationsprodukt wurde anschließend als EcoRI-Fragment in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pPIC-9 des Pichia Expressions Kit (Invitrogen) kloniert (Abb. 11). Um eine intrazelluläre Akkumulation des Transketolase Enzyms zu gewährleisten wurde das Plasmid TK23-BC-pHIL-D2 hergestellt. Zur besseren Aufreinigung des Enzyms wurde ein 5'-PCR Primer (s. Abb. 9) zur Amplifikation der Transketolase verwendet, der ein Startkodon für die Translation enthält und für sechs Histidinreste kodiert. Nach PCR-Amplifikation der in Abbildung 9 angegebenen TK-23 Sequenz wurde das TK-23-BC-Produkt in den Vektor pGEM-T kloniert. Das TK23-BC PCR-Amplifikationsprodukt wurde anschließend als EcoRI-Fragment in die EcoRI-Schnittstelle des Vektors pHIL-D2 des Pichia Expressions Kit (Invitrogen) kloniert (Abb. 12).

7. Expression der pflanzlichen Transketolase in E. coli

Zur Überexpression der Transketolase in E. coli wurden 2 ml LB-Medium mit XL-1 E-coli Zellen beimpft, die das Plasmid TK23-AC-pQU-9 enthielten. Die Kulturen wurden über Nacht bei 28°C in Anwesenheit von Antibiotika und unter Schütteln angezogenen. Anschließend wurden die Übernachtkulturen in 20 ml Wachstumsmedium (LB-Medium komplettiert mit: 10 µg/ml Tetracyclin, 200 µg/ml Ampicillin, 1 mM Vitamin B1, 1mM MgSO₄) überführt. Das Wachstum erfolgte bei 28°C unter Schütteln. Nach 3 Stunden wurde die Expression der Transketolase durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert. Der Nachweis des produzierten Proteins wurde durch Auftrennung der Proteine

in einem SDS-PAGE (Laemmli (1970) Nature 227, 680-685) mit anschließender Coomassie-Färbung der Proteine durchgeführt. Als Kontrollen dienten Kulturen, die entweder nicht mit IPTG induziert wurden, oder Kulturen, die die Transketolase in Gegensinnorientierung enthielten. Das Ergebnis eines Induktions-Experiments ist in Abbildung 13 dargestellt. Ein Protein der entsprechenden Größe akkumulierte in Bakterienkulturen, die mit IPTG induziert wurden und das Plasmid TK23-AC-pQE-9 enthielten. Die Akkumulation beginnt eine Stunde nach Induktion. In den Kontrollen (ohne IPTG bzw. Transketolase in Gegensinnorientierung) ist kein vergleichbares Protein identifizierbar.

5 Abbildungen

10 1. Reduktiver Pentosephosphatzzyklus
2. Verknüpfung des Pentosephosphatzzyklus mit anderen Stoffwechselwegen
3. Nukleotidsequenz der plastidären Transketolase aus Tabak
4. Aminosäurevergleich der plastidären Transketolase mit Transketolase 1 und 2 aus Hefe
5. Nachweis der Transketolase mRNA in unterschiedlichen Tabakgeweben
15 6. Schematische Darstellung der Transketolase cDNA-Klone
7. Schematische Darstellung der Plasmide BinAR-TK-26-anti und BinAR-TK-28-anti
8. Northernanalyse transgener Tabakpflanzen
9. Strategie und Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation der plastidären Transketolase
10. Schematische Darstellung des Plasmides TK23-AC-pQE-9
20 11. Schematische Darstellung des Plasmides TK23-AC-pPIC-9
12. Schematische Darstellung des Plasmides TK23-BC-pHIL-D2
13. Überexpression der pflanzlichen Transketolase in E. coli

25

30

35

40

45

50

55

SEQUENZPROTOKOLL

5 (1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

10 (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
(B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
15 (C) ORT: Ludwigshafen
(E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
20 (F) POSTLEITZAHL: D-67056
(G) TELEPHON: 0621/6048526
25 (H) TELEFAX: 0621/6043123
(I) TELEX: 1762175170
30 (ii) ANMELDETITEL: Transketolase aus Pflanzen
(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2
(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:
35 (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

40 (A) LÄNGE: 2629 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzel
(D) TOPOLOGIE: linear
45 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Nicotiana
50 (ix) MERKMALE:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 60..2289
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

	CTCCTCTTCA	CTCTCTTTTC	TCTTGAGAC	AAAACATCAA	ACACCTTACT	GGTAAAGCC	59
	ATG GCG TCT	TCT CTC ACT	CTC TCT CAA	GCT ATC CTC	TCT CGT		107
5	Met Ala Ser	Ser Ser Ser	Leu Thr Leu Ser	Gln Ala Ile	Leu Ser Arg		
	1	5	10	15			
	TCT GTC CCT	CGC CAT GGC	TCT GCC TCT	TCT CAA CTT	TCC CCT TCT		155
	Ser Val Pro	Arg His Gly	Ser Ala Ser	Ser Gln Leu	Ser Pro Ser		
	20	25	30				
10	TCT CTC ACT	TTT TCC GGC	CTT AAA TCC	AAT CCC AAT	ATC ACC ACC TCC		203
	Ser Leu Thr	Phe Ser Gly	Leu Lys Ser	Asn Pro Asn	Ile Thr Thr Ser		
	35	40	45				
	CGC CGC CGT	ACT CCT TCC	TCC GCC GCC	GCC GTC	GTA AGG TCA		251
15	Arg Arg Arg	Thr Pro Ser	Ser Ala Ala	Ala Ala Val	Val Arg Ser		
	50	55	60				
	CCG GCG ATT	CGT GCC TCA	GCT GCA ACC	GAA ACC ATA	GAG AAA ACT	GAG	299
	Pro Ala Ile	Arg Ala Ser	Ala Ala Thr	Glu Thr Ile	Glu Lys Thr	Glu	
	65	70	75	80			
20	ACT GCG CTT	GTT GAC AAA	TCT GTC AAC	ACG ATT CGA	TTT TTG GCT	ATT	347
	Thr Ala Leu	Val Asp Lys	Ser Val Asn	Thr Ile Arg	Phe Leu Ala	Ile	
	85	90	95				
	GAT GCT GTT	GAA AGG CAA ATT	CGG GTC ACC	CGG TTT GCC	ATG GGT TGT		395
25	Asp Ala Val	Glu Arg Gln	Ile Arg Val	Thr Arg Phe	Ala Met Gly	Cys	
	100	105	110				
	GCT CCG ATG	GGT CAT ATA	TTG TAC GAT	GAG GTT ATG	AGG TAT AAC	CCG	443
	Ala Pro Met	Gly His Ile	Leu Tyr Asp	Glu Val Met	Arg Tyr Asn	Pro	
	115	120	125				
30	AAA AAC CCG	TAT TGG TTT	AAT CGG GAT	CGG TTT GTT	CTA TCA GCT	GGA	491
	Lys Asn Pro	Tyr Trp Phe	Asn Arg Asp	Arg Phe Val	Leu Ser Ala	Gly	
	130	135	140				
	CAT GGT TGT	ATG CTT CAG	TAT GCT TTG	CTT CAT CTA	GCT GGC	TAT GAT	539
35	His Gly Cys	Met Leu Gln	Tyr Ala Leu	Leu His Leu	Ala Gly	Tyr Asp	
	145	150	155	160			
	GCT GTC AGG	GAA GAG GAC	TTG AAG AGC	TTC CGT CAG	TGG GGA ACC	AAA	587
	Ala Val Arg	Glu Glu Asp	Leu Lys Ser	Phe Arg Gln	Trp Gly	Thr Lys	
	165	170	175				
40	ACC CCT GGA	CAC CCT GAA	AAC TTT GAG	ACA CCT GGT	GTT GAA GTC	ACC	635
	Thr Pro Gly	His Pro Glu	Asn Phe	Glu Thr Pro	Gly Val	Glu Val Thr	
	180	185	190				
	ACC GGG CCT	CTG GGA CAA	GGT ATT GCC	AAC GCC GTT	GGC TTG GCT	CTT	683
45	Thr Gly Pro	Leu Gly Gln	Gly Ile Ala	Asn Ala Val	Gly Leu	Ala Leu	
	195	200	205				
	GTG GAG AAA	CAC TTG GCT	CGT TTC AAT	AAG CCT GAC	GCT GAG ATT		731
	Val Glu Lys	His Leu Ala	Ala Arg Phe	Asn Lys Pro	Asp Ala Glu	Ile	
	210	215	220				
50	GTA GAC CAC	TAC ACA TAT	GTT ATT CTC	GGT GAT	GGT TGC CAG	ATG GAG	779
	Val Asp His	Tyr Thr Tyr	Val Ile Leu	Gly Asp Gly	Cys Gln	Met Glu	
	225	230	235	240			

5	GGT ATT TCA CAA GAA GCT TGT TCC CTT GCT GGA CAC TGG GGA CTT GGA Gly Ile Ser Gln Glu Ala Cys Ser Leu Ala Gly His Trp Gly Leu Gly 245 250 255	827
10	AAG CTG ATT GCT TTC TAT GAT GAC AAC CAC ATC TCA ATT GAT GGT GAC Lys Leu Ile Ala Phe Tyr Asp Asp Asn His Ile Ser Ile Asp Gly Asp 260 265 270	875
15	ACA GAA ATC GCT TTC ACT GAG GAT GTT GGT GCC CGT TTT GAG GCT CTT Thr Glu Ile Ala Phe Thr Glu Asp Val Gly Ala Arg Phe Glu Ala Leu 275 280 285	923
20	GGG TGG CAC GTA ATC TGG GTG AAG AAC GGT AAC ACT GGT TAT GAT GAG Gly Trp His Val Ile Trp Val Lys Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asp Glu 290 295 300	971
25	ATT CGT GCT ATT AAG GAA GCA AAA ACT GTC ACA GAC AAA CCC ACT Ile Arg Ala Ala Ile Lys Glu Ala Lys Thr Val Thr Asp Lys Pro Thr 305 310 315 320	1019
30	ATG ATC AAG GTG ACT ACA ACC ATT GGT TTT GGC TCG CCC AAC AAG GCA Met Ile Lys Val Thr Thr Ile Gly Phe Gly Ser Pro Asn Lys Ala 325 330 335	1067
35	AAC AGT TAC AGT GTA CAT GGA AGT GCA CTT GGA GCT AAG GAA GTA GAG Asn Ser Tyr Ser Val His Gly Ser Ala Leu Gly Ala Lys Glu Val Glu 340 345 350	1115
40	GCC ACC AGG AGT AAC TTG GGA TGG CCT TAT GAG CCT TTC CAT GTG CCT Ala Thr Arg Ser Asn Leu Gly Trp Pro Tyr Glu Pro Phe His Val Pro 355 360 365	1163
45	GAA GAT GTC AAG AGC CAT TGG AGT CGT CAT GTT CCC GAG GGT GCT GCT Glu Asp Val Lys Ser His Trp Ser Arg His Val Pro Glu Gly Ala Ala 370 375 380	1211
50	CTT GAA GCT GGG TGG AAT ACC AAG TTT GCT GAA TAT GAG AAG AAG TAC Leu Glu Ala Gly Trp Asn Thr Lys Phe Ala Glu Tyr Glu Lys Lys Tyr 385 390 395 400	1259
55	CCA GAG GAA GCT GCA GAA CTC AAA TCC ATT ACT ACT GGT GAA CTA CCT Pro Glu Glu Ala Ala Glu Leu Lys Ser Ile Thr Thr Gly Glu Leu Pro 405 410 415	1307
60	GCT GGC TGG GAG AAA GCT CTT CCT ACC TAC ACA CCT GAA AGT CCA GCG Ala Gly Trp Glu Lys Ala Leu Pro Thr Tyr Thr Pro Glu Ser Pro Ala 420 425 430	1355
65	GAT GCC ACC AGA AAC CTG TCC CAA CAA AAC CTG AAT GCT CTT GCC AAG Asp Ala Thr Arg Asn Leu Ser Gln Gln Asn Leu Asn Ala Leu Ala Lys 435 440 445	1403
70	GTT CTT CCT GGT TTC CTT GGT GGT AGT GCT GAT CTT GCC TCA TCA AAC Val Leu Pro Gly Phe Leu Gly Ser Ala Asp Leu Ala Ser Ser Asn 450 455 460	1451
75	ATG ACC CTC ATG AAA ATG TTT GGT GAC TTC CAA AAG AAC ACC CCA GAG Met Thr Leu Met Lys Met Phe Gly Asp Phe Gln Lys Asn Thr Pro Glu 465 470 475 480	1499

	GAG CGT AAT CTA AGG TTT GGT GTT CGT GAA CAT GGT ATG GGA GCC ATA		1547
	Glu Arg Asn Leu Arg Phe Gly Val Arg Glu His Gly Met Gly Ala Ile		
5	485	490	495
	TGT AAT GGT AAT GCT CTA CAC AGC CCT GGC TTG ATT CCC TAC TGT GCT		1595
	Cys Asn Gly Asn Ala Leu His Ser Pro Gly Leu Ile Pro Tyr Cys Ala		
	500	505	510
10	ACT TTC TTT GTG TTC ACC GAC TAC ATG AGA GGA GCT ATG AGA ATT TCA		1643
	Thr Phe Val Phe Thr Asp Tyr Met Arg Gly Ala Met Arg Ile Ser		
	515	520	525
	GCC TTG TCT GAG GCT GGA GTT ATT TAT GTT ATG ACC CAC GAT TCA ATT		1691
	Ala Leu Ser Glu Ala Gly Val Ile Tyr Val Met Thr His Asp Ser Ile		
15	530	535	540
	GGT CTA GGA GAA GAT GGG CCT ACC CAT CAA CCC ATT GAG CAC TTG CCA		1739
	Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Ile Glu His Leu Pro		
	545	550	555
20	560		
	AGT TTC CGT GCA ATG CCC AAC ATT CTG ATG TTC CGT CCA GCA GAT GGC		1787
	Ser Phe Arg Ala Met Pro Asn Ile Leu Met Phe Arg Pro Ala Asp Gly		
	565	570	575
	AAG GAG ACA GCG GGA GCT TAC AAG GTG GCT GTC CTC AAG AGG AAG ACA		1835
	Lys Glu Thr Ala Gly Ala Tyr Lys Val Ala Val Leu Lys Arg Lys Thr		
25	580	585	590
	CCA TCA ATC CTT GCC CTC TCT CGG CAA AAG TTG CCA CAA CTT GCT GGA		1883
	Pro Ser Ile Leu Ala Leu Ser Arg Gln Lys Leu Pro Gln Leu Ala Gly		
	595	600	605
30	610	615	620
	AGT TCT ATT GAA GGA GCA GCA AAG CGT GGC TAC ATT TTA TCA GAC AAT		1931
	Ser Ser Ile Glu Gly Ala Ala Lys Arg Gly Tyr Ile Leu Ser Asp Asn		
	625	630	635
35	640		
	TTA GAA ATT GCT GTC AAG GCT GAT GAA CTC AGG AAA GAA GGA AAA		2027
	Leu Glu Ile Ala Val Lys Ala Ala Asp Glu Leu Arg Lys Glu Gly Lys		
	645	650	655
40	660	665	670
	GCA GTG AGA GTT GTT TCC TTT GTT TGT TGG GAG CTT TTT GAA GAA CAA		2075
	Ala Val Arg Val Val Ser Phe Val Cys Trp Glu Leu Phe Glu Glu Gln		
	675	680	685
45	690	695	700
	TCA GCC GAC TAC AAG GAA AGT GTC CTT CCA TCA TCT GTT ACA GCT AGA		2123
	Ser Ala Asp Tyr Lys Glu Ser Val Leu Pro Ser Ser Val Thr Ala Arg		
	705	710	715
50	720		

5	GCT GGA AAA ATA TAC AAG GAG TAC GGA ATT ACA GCA GAG GCT GTT GTA Ala Gly Lys Ile Tyr Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Ala Glu Ala Val Val 725 730 735	2267
10	GCT GCA GCT AAA CAA GTT TCT T AGGCTTTATT ACTTACCCCTT GGTTGCTGGT Ala Ala Ala Lys Gln Val Ser 740	2319
15	GTCTACCAAA TTTGTTTCA TTTTGAAACT GAGGTTGGAG ATAACGGTGG AAACCAATAC CAAACGGACT CGGCAGTTCA CTGTTGCCCTG GTATTTCAA TAAAAACTAT TTCTTCATCT GTCCTTGTGTT TTCTTCAGTT TTAGTAGCGG AGCGGCCAAA ATGAATCCAA GATGAGGATA GAAATAGGAT TATGGATGCT CCTGACCATG TACACTTAAA ACATATCTGT GAGTTTGTA ATTTTATTTG GTCGAGTGAT ACCAAGATCT CATTTCATAA TGAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAA	2379 2439 2499 2559 2619 2629
20	(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2: (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA: (A) LÄNGE: 743 Aminosäuren (B) ART: Aminosäure (D) TOPOLOGIE: linear	
25	(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:	
30	Met Ala Ser Ser Ser Ser Leu Thr Leu Ser Gln Ala Ile Leu Ser Arg 1 5 10 15 Ser Val Pro Arg His Gly Ser Ala Ser Ser Ser Gln Leu Ser Pro Ser 20 25 30 Ser Leu Thr Phe Ser Gly Leu Lys Ser Asn Pro Asn Ile Thr Thr Ser 35 40 45 Arg Arg Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ala Ala Ala Val Val Arg Ser 50 55 60 Pro Ala Ile Arg Ala Ser Ala Ala Thr Glu Thr Ile Glu Lys Thr Glu 65 70 75 80 35	
35	Thr Ala Leu Val Asp Lys Ser Val Asn Thr Ile Arg Phe Leu Ala Ile 85 90 95 Asp Ala Val Glu Arg Gln Ile Arg Val Thr Arg Phe Ala Met Gly Cys 100 105 110	
40	Ala Pro Met Gly His Ile Leu Tyr Asp Glu Val Met Arg Tyr Asn Pro 115 120 125 Lys Asn Pro Tyr Trp Phe Asn Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser Ala Gly 130 135 140	
45	His Gly Cys Met Leu Gln Tyr Ala Leu Leu His Leu Ala Gly Tyr Asp 145 150 155 160 Ala Val Arg Glu Glu Asp Leu Lys Ser Phe Arg Gln Trp Gly Thr Lys 165 170 175	
50	Thr Pro Gly His Pro Glu Asn Phe Glu Thr Pro Gly Val Glu Val Thr 180 185 190 Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Ile Ala Asn Ala Val Gly Leu Ala Leu 195 200 205	

	Val Glu Lys His Leu Ala Ala Arg Phe Asn Lys Pro Asp Ala Glu Ile			
	210	215	220	
5	Val Asp His Tyr Thr Tyr Val Ile Leu Gly Asp Gly Cys Gln Met Glu			
	225	230	235	240
	Gly Ile Ser Gln Glu Ala Cys Ser Leu Ala Gly His Trp Gly Leu Gly			
	245	250	255	
10	Lys Leu Ile Ala Phe Tyr Asp Asp Asn His Ile Ser Ile Asp Gly Asp			
	260	265	270	
	Thr Glu Ile Ala Phe Thr Glu Asp Val Gly Ala Arg Phe Glu Ala Leu			
	275	280	285	
	Gly Trp His Val Ile Trp Val Lys Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asp Glu			
15	290	295	300	
	Ile Arg Ala Ala Ile Lys Glu Ala Lys Thr Val Thr Asp Lys Pro Thr			
	305	310	315	320
	Met Ile Lys Val Thr Thr Ile Gly Phe Gly Ser Pro Asn Lys Ala			
	325	330	335	
20	Asn Ser Tyr Ser Val His Gly Ser Ala Leu Gly Ala Lys Glu Val Glu			
	340	345	350	
	Ala Thr Arg Ser Asn Leu Gly Trp Pro Tyr Glu Pro Phe His Val Pro			
	355	360	365	
25	Glu Asp Val Lys Ser His Trp Ser Arg His Val Pro Glu Gly Ala Ala			
	370	375	380	
	Leu Glu Ala Gly Trp Asn Thr Lys Phe Ala Glu Tyr Glu Lys Lys Tyr			
	385	390	395	400
30	Pro Glu Glu Ala Ala Glu Leu Lys Ser Ile Thr Thr Gly Glu Leu Pro			
	405	410	415	
	Ala Gly Trp Glu Lys Ala Leu Pro Thr Tyr Thr Pro Glu Ser Pro Ala			
	420	425	430	
	Asp Ala Thr Arg Asn Leu Ser Gln Gln Asn Leu Asn Ala Leu Ala Lys			
35	435	440	445	
	Val Leu Pro Gly Phe Leu Gly Gly Ser Ala Asp Leu Ala Ser Ser Asn			
	450	455	460	
	Met Thr Leu Met Lys Met Phe Gly Asp Phe Gln Lys Asn Thr Pro Glu			
	465	470	475	480
40	Glu Arg Asn Leu Arg Phe Gly Val Arg Glu His Gly Met Gly Ala Ile			
	485	490	495	
	Cys Asn Gly Asn Ala Leu His Ser Pro Gly Leu Ile Pro Tyr Cys Ala			
	500	505	510	
45	Thr Phe Phe Val Phe Thr Asp Tyr Met Arg Gly Ala Met Arg Ile Ser			
	515	520	525	
	Ala Leu Ser Glu Ala Gly Val Ile Tyr Val Met Thr His Asp Ser Ile			
	530	535	540	
50	Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Ile Glu His Leu Pro			
	545	550	555	560
	Ser Phe Arg Ala Met Pro Asn Ile Leu Met Phe Arg Pro Ala Asp Gly			
	565	570	575	

Lys Glu Thr Ala Gly Ala Tyr Lys Val Ala Val Leu Lys Arg Lys Thr
 580 585 590
 5 Pro Ser Ile Leu Ala Leu Ser Arg Gln Lys Leu Pro Gln Leu Ala Gly
 595 600 605
 Ser Ser Ile Glu Gly Ala Ala Lys Arg Gly Tyr Ile Leu Ser Asp Asn
 610 615 620
 10 Ser Ser Gly Asn Lys Pro Asp Val Ile Leu Ile Gly Thr Gly Ser Glu
 625 630 635 640
 Leu Glu Ile Ala Val Lys Ala Ala Asp Glu Leu Arg Lys Glu Gly Lys
 645 650 655
 15 Ala Val Arg Val Val Ser Phe Val Cys Trp Glu Leu Phe Glu Glu Gln
 660 665 670
 Ser Ala Asp Tyr Lys Glu Ser Val Leu Pro Ser Ser Val Thr Ala Arg
 675 680 685
 20 Val Ser Ile Glu Ala Gly Ser Thr Phe Gly Trp Glu Lys Tyr Val Gly
 690 695 700
 Ser Lys Gly Lys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Trp Gly Ala Ser Ala Pro
 705 710 715 720
 25 Ala Gly Lys Ile Tyr Lys Glu Tyr Gly Ile Thr Ala Glu Ala Val Val
 725 730 735
 Ala Ala Ala Lys Gln Val Ser
 740

30

Patentansprüche

35 1. Protein mit Transketolase Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ ID NO 2 darstellt.

40 2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die Teilsequenz 78-743 aus SEQ ID NO 2 enthält.

45 3. Protein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die in SEQ ID NO 2 dargestellte Sequenz enthält.

50 4. Nukleinsäure, codierend für ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1-3.

55 5. Nukleinsäure nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus der in SEQ ID NO 1 dargestellten Sequenz besteht.

6. Vektoren, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 4 oder 5 zusammen mit funktionellen Regulationssignalen.

7. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 1-3 zur Identifizierung von herbiziden Wirkstoffen.

8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Identifizierung mittels eines *in vitro* Testsystems erfolgt.

9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Testsystem ein Enzymhemmtest eingesetzt wird.

10. Testsystem zur Identifizierung von Transketolase-Inhibitoren, dadurch gekennzeichnet, daß man die potentiellen Inhibitoren mit einem Protein gemäß Anspruch 1-3 inkubiert und anschließend die Transketolase Aktivität bestimmt.
- 5 11. Herbizide Wirkstoffe, identifizierbar mittels eines Testsystems gemäß Anspruch 10.
12. Verfahren zur Herstellung von Herbiziden, die eine pflanzliche Transketolase inhibieren, dadurch gekennzeichnet, daß man bekanntechemische Verbindungen in einem Testverfahren gemäß Anspruch 10 überprüft und solche mit inhibierender Wirkung mit üblichen Träger- und Hilfsstoffen als Herbizid formuliert.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

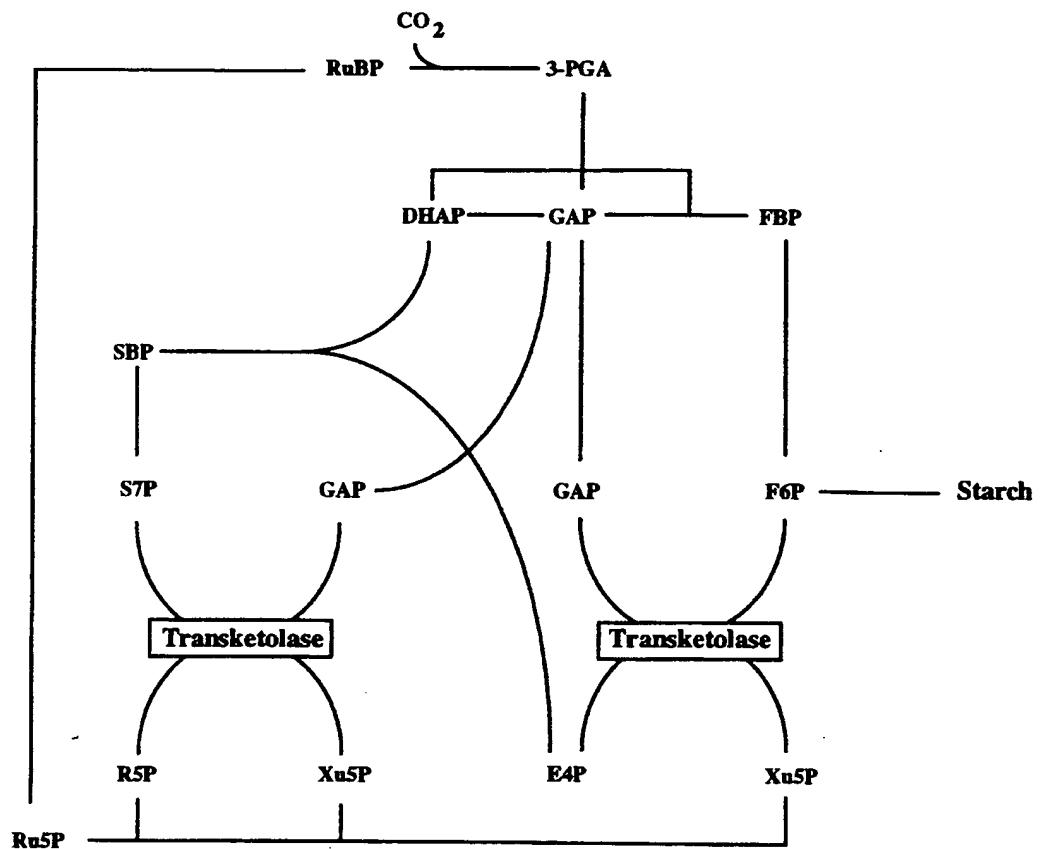


Abbildung 1

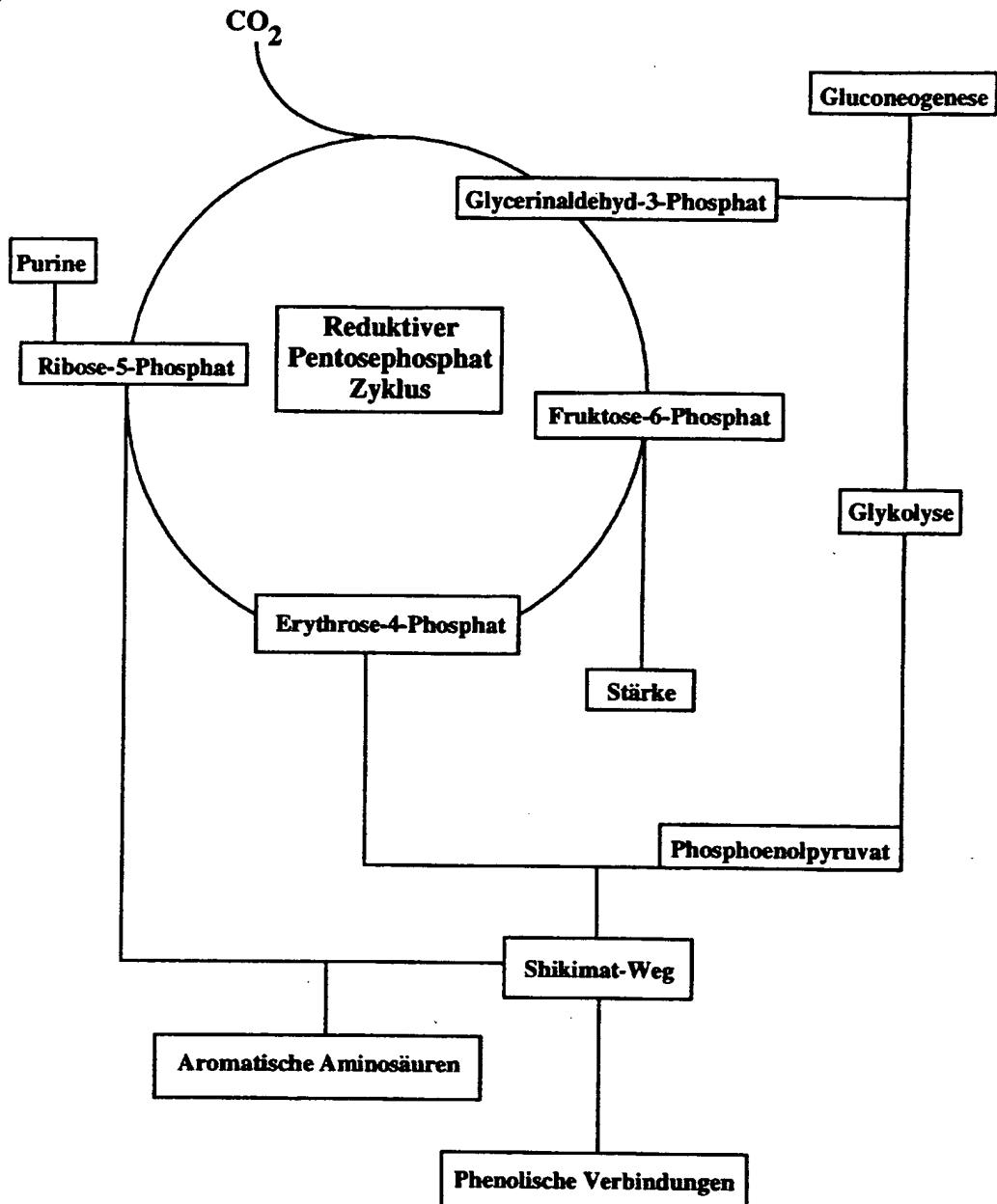


Abbildung 2

1	CTCCTCTTCA	CTCTCTTTTC	TCTTTGAGAC	AAAACATCAA	ACACCTTACT	50
51	GGTAAAGCCA	TGGCGTCTTC	TTCTCTCTC	ACTCTCTCTC	AAGCTATCCT	100
101	CTCTCGTTCT	GTCCCTCGCC	ATGGCTCTGC	CTCTTCTTCT	CAACTTTCCC	150
151	CTTCTCTCTC	CACTTTTCC	GGCCTTAAAT	CCAATCCCAA	TATCACCACC	200
201	TCCCCGCCGCC	GTACTCCTTC	CTCCGCGCC	GCCGCCGCC	TCGTAAGGTC	250
251	ACCGGCGATT	CGTGCCTCAG	CTGCAACCAGA	AACCATAGAG	AAAACGTAGA	300
301	CTGCGCTTGT	TGACAAATCT	GTAAACACGA	TTCGATTTTT	GGCTATTGAT	350
351	GCTGTTGAAA	GGCAAATTG	GGTCACCCGG	TTTGCATGG	GTGTCGCTCC	400
401	GATGGGTCAT	ATATTGTACG	ATGAGGTTAT	GAGGTATAAC	CCGAAAAAAC	450
451	CGTATTGGTT	TAATCGGGAT	CGGTTTGTTC	TATCAGCTGG	ACATGGTTGT	500
501	ATGCTTCAGT	ATGCTTGTCT	TCATCTAGCT	GGCTATGATG	CTGTCAGGG	550
551	AGAGGACTTG	AAGAGCTTCC	GTCAGTGGGG	AAGCAAAACC	CCTGGACACC	600
601	CTGAAAACCT	TGAGACACCT	GGTGTGAAAG	TCACCCACGG	GCCTCTGGGA	650
651	CAAGGTATTG	CCAACGCCGT	TGGCTTGGCT	CTTGTGGAGA	AACACTTGGC	700
701	TGCTCGTTTC	AATAAGCCTG	ACGCTGAGAT	TGTAGACCAC	TACACATATG	750
751	TTATTCTCGG	TGATGGTTGC	CAGATGGAGG	GTATTTCACA	AGAAGCTTGT	800
801	TCCCTTGCTG	GACACTGGGG	ACTTGGAAAG	CTGATTGCTT	TCTATGATGA	850
851	CAACCACATC	TCAATTGATG	GTGACACAGA	AATCGCTTTC	ACTGAGGATG	900
901	TTGGTGGCCCG	TTTGAGGCT	CTTGGGTGGC	ACGTAATCTG	GGTGAAGAAC	950
951	GGTAACACTG	GTTATGATGA	GATTCTGCT	GCTATTAAGG	AACCAAAAC	1000
1001	TGTCACAGAC	AAACCCACTA	TGATCAAGGT	GACTACAACC	ATIGGTTTIG	1050
1051	GCTCGCCCAA	CAAGGCAAAC	AGTTACAGTG	TACATGGAAAG	TGCACTTGG	1100
1101	GCTAAGGAAG	TAGAGGCCAC	CAGGAGTAAC	TTGGGATGGC	CTTATGAGCC	1150
1151	TTTCCATGTG	CCTGAAGATG	TCAAGAGCCA	TTGGAGTCGT	CATGTTCCCG	1200
1201	AGGGTGTGTC	TCTTGAAGCT	GGGTGGAAATA	CCAAGTTTGC	TGAATATGAG	1250
1251	AAGAAGTACC	CAGAGGAAGC	TGCAGAAC	AAATCCATTA	CTACTGGTGA	1300
1301	ACTACCTGCT	GGCTGGGAGA	AAGCTCTTCC	TACCTACACA	CCTGAAAGTC	1350
1351	CAGCGGATGC	CACCAAGAAC	CTGTCCCAAC	AAAACCTGAA	TGCTCTGCC	1400
1401	AAGGTTCTTC	CTGGTTTCC	TGGTGGTAGT	GCTGATCTTG	CCTCATCAA	1450
1451	CATGACCCCTC	ATGAAAATGT	TTGGTGACTT	CCAAAAGAAC	ACCCCAGAGG	1500
1501	AGCGTAATCT	AAGGTTGGT	GTTCGTGAAC	ATGGTATGGG	AGCCATATGT	1550
1551	AATGGTAATG	CTCTACACAG	CCCTGGCTTG	ATTCCCTACT	GTGCTACTTT	1600
1601	CTTTGTGTTTC	ACCGACTACA	TGAGAGGAGC	TATGAGAATT	TCAGCCTTGT	1650
1651	CTGAGGCTGG	AGTTATTTAT	GTTATGACCC	ACGATTCAAT	TGGTCTAGGA	1700
1701	GAAGATGGGC	CTACCCATCA	ACCCATTGAG	CACTTGGCAA	TTTCCGTGC	1750
1751	AATGCCAAC	ATTCTGATGT	TCCGTCCAGC	AGATGGCAAG	GAGACAGCGG	1800
1801	GAGCTTACAA	GGTGGCTGTC	CTCAAGAGGA	AGACACCAC	AATCCTTGCC	1850
1851	CTCTCTCGGC	AAAAGTTGCC	ACAACCTGCT	GGAAGTTCTA	TTGAAGGAGC	1900
1901	AGCAAAGGGT	GGCTACATT	TATCAGACAA	TTCTTCTGGC	AACAAACCTG	1950
1951	ATGTCATTTT	GATTGGTACT	GGCTCAGAGT	TAGAAATTGC	TGTCAAGGCT	2000
2001	GCTGATGAAC	TCAGGAAAGA	AGGAAAAGCA	GTGAGAGTTG	TTTCCTTTGT	2050
2051	TTGTTGGGAG	CTTTTGAAAG	AAACATCAGC	CGACTACAAAG	GAAGATGTCC	2100
2101	TTCCCATCATC	TGTTACAGCT	AGAGTTAGCA	TTGAGGCCGG	ATCCACATTT	2150
2151	GGGTGGGAGA	AATATGTCGG	ATCAAAGGG	AAGGCCATCG	GAATTGACAG	2200
2201	ATGGGGTGCC	AGTGCCCTTG	CTGGAAAAAT	ATACAAGGAG	TACGGAATT	2250
2251	CAGCAGAGGC	TGTTGTAGCT	GCAGCTAAC	AAAGTTCTTA	GGCTTATTA	2300
2301	CTTACCTTTC	GTGCTGGTG	TCTACAAAT	TTGTTTICAT	TTTGAAGACTG	2350
2351	AGGTGAGAGA	TAACGGTGG	AAACCAATACC	AAACGGACTC	GGCAGTTCAC	2400
2401	TGTTGCCTGG	TATTTCAAT	AAAAACTATT	TCTTCATCTG	TCCTTGT	2450
2451	TCTTCAGTTT	TAGTAGCGGA	GCGGCCAAAA	TGAATCCAAG	ATGAGGATAG	2500
2501	AAATAGGATT	ATGGATGCTC	CTGACCAGTGT	ACACTAAAAA	CATATCTGTG	2550
2551	AGTTTTGTAA	TTTTATTG	TCGAGTGATA	CCAAGATCTC	ATTTCAATT	2600
2601	GGAAAAAAA	AAAAAAA	AAAAAAA			2629

Abbildung 3

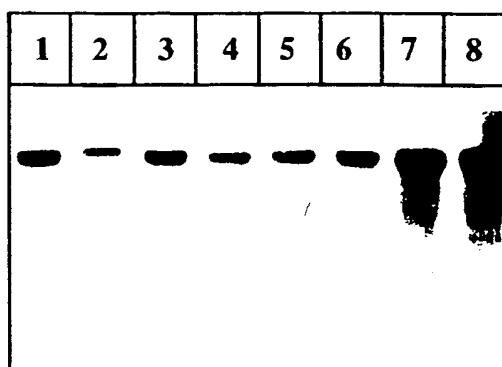
Aminosäurevergleich der plastidären Transketolase aus Tabak mit Transketolase

Isoenzyme aus *Saccharomyces cerevisiae*

TK-23	1	MASSSSL TLSQAILSRS	17
TK-23	18	VPRHGSASSS QLSPSSLTFS GLKSNPNTT SRRRTPSSAA AAAVRSPAI RASAATETIE	77
TK-23	78	KTETALVDKS -VNTIRFLAI DAVERQIRVT RFAMGCAPMG HILYDEVMRY NPKNPYWFNR	136
TKL1	1	M.QFTDI..L A.S...I..V .T.SKANSGH PG.PLGMAPA AHVLWSQ..M ..T..D.I..	60
TKL2	1	MAQFSDI..L A.S.L.L.SV .Q..SAQSGH PG.PLGLAPV AHVIFKQL.C ..N.EH.I..	60
TK-23	137	DRFVLSAGHG CMLQYALLHL AGYDAVREED LKSFRQWGSK TPGHPENFET PGVEVTTGPL	196
TKL1	61N..A VA.L.SM... T...L-SI... Q...L..RL	118
TKL2	61N..S .A.L.SM... L...Y-SI... RQ...VN.RHS A...I.S...	118
TK-23	197	QOGIANAVGL ALVEKHLAAR FNKPDAEIVD HYTYVILGDG CQMEGISQEA CSLAGHWGLG	256
TKL1	119S....M .MAQAN..T Y...GFTLS. N....F....LQ....S..S....LK..	178
TKL2	119S....M .IAQANF..T Y.EDGFP.S. S..FA.V....LQ..V.S.T S....LQ..	178
TK-23	257	KLIAFYDDNH ISIDGDTEIA FTEDVGARFE ALGWHVIWVK NGNTGYDEIR AAIKEAKTVT	316
TKL1	179	N....I....K .T...A.S.S .D...AK.Y. .Y..E.LY.E ...EDLAG.A K..AQ..LSK	238
TKL2	179	N..T...S.SK.SYS .D...LK.Y. .Y..E.ME.D K.DDDMES.S S.LEK..LSK	238
TK-23	317	DRPTMIKVTT TIGFGSPNKA NSYSVHGSAL GAKEVATRS NLGW-PYEPP HVPEDVKSHP	375
TKL1	239L..M.. ...Y..LHAG -H...AP. K.DD.QQLKS KF.FN.DKS. V..QE.YDHY	297
TKL2	239I.....LQOG TA-G..... K.DD.QQLKK RW.FD.NKS. V..QE.YDYY	297
TK-23	376	SRHVPEGAAL EAG-WNTKFA EYEKYPPEA AELKSITTGE LPAWGEKALP TYTPESPADA	434
TKL1	298	QKTIILKPGVE ANNK.NKL.S ..Q..F..LG A..ARRLS.Q ...N..SK.. ...AKDS.V.	357
TKL2	298	KKT.V.PGQK LNEE.DR..E ..KT.F..KG K..QRRLN.E ..E...KH.. KF..DDD.L.	356
TK-23	435	TRNLSQQNLN ALAKVLPGL GGSADLASSN MTLMRMFGDF QKNTPEERN- LRPGVREHGM	493
TKL1	358	..KL.ETV.E DVYNQ..ELITP.. L.RWKEAL.. .PPSSGSG.Y SGRYI.YGIR	417
TKL2	357	..KT...V.T NMVQV..ELITP.. L.RWEGAV.. .PPITQLG.Y AGRYI.YGVR	416
TK-23	494	---GAICNG NALHSPCLIP YCATFFVFTD YMRGAMRISA LSEAGVIYVM THDSIGLGED	549
TKL1	418	EHAM...M.. ISAFGANIK. .GG..LN.VS .AA..V.L.. ..GHP..W.AV...	477
TKL2	417	EHG...M.. ISAFGANIK. .GG..LN.VS .AA..V.LA. ..GNP..W.A	475
TK-23	550	GPTHQPIEHL ASFRAMPNIL MFRPADGKET AGAYKAVVLK RKTPSILALS RQKLPQLAGS	609
TKL1	478T. .H..SL...Q VW....N.V SA...NSLES KH....I... ..N....E..	537
TKL2	476T. .HL..I..HV -W....N.T SA..YS.IKS GR...VV... ..N....EH.	534
TK-23	610	SIEGAAKGGY ILSDNSSGMK PDVILIGTGS ELEIAVKAAD ELR-REGKAV RVVSFVCWEL	668
TKL1	538	...S.S.... V.Q.VA---N ..I..VA... .VSL.S.E..K T.AA.NI..- ..LPDFFT	593
TKL2	535	.F.K.L.... VIH.VE---N ..I..VS... .VS.SID..K K.YDTKKIKA ...LPDFYT	591
TK-23	669	FEEQSADYKE SVPSSVTA R VSIEAGSTFG WEKYVGSKGK AIGIDRWGAS APAGKIVKEY	727
TKL1	595	.DK.PLE.RLDN.PIM -.V.VLA.TC .G..AHQSFG IDRFGAS.KA PEVF.FFGFT	652
TKL2	592	.DR..EE.RFDG.PIM -.F.VLA.SS .G..AHQSFG LDEFGRS.KG PEIY.LFDFT	650
TK-23	728	GITAEAVVAA AKQVS	743
TKL1	653	PEGVAERAQK TIAFYKGDKL ISPLKKA F	680
TKL2	651	ADGVASRAEK TINYKGKQL LSPMGR A F	678

Abbildung 4

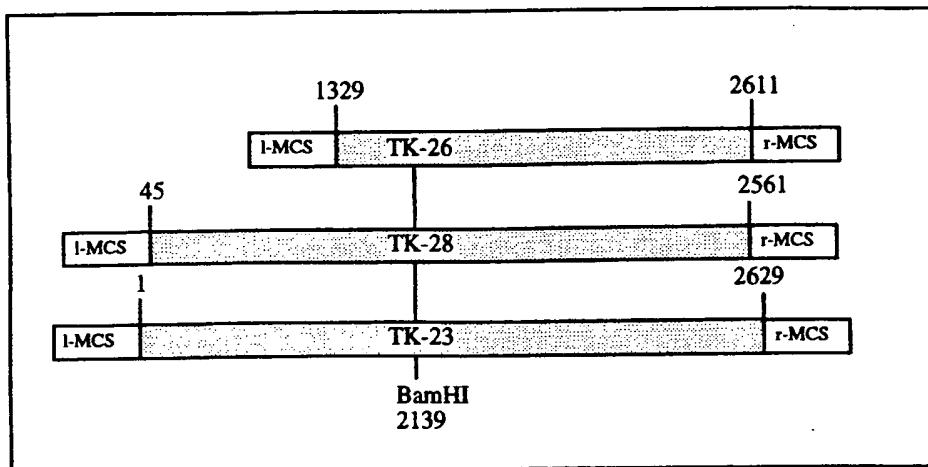
**Gewebespezifische Expression der plastidären Transketolase in
Tabakpflanzen**



Legende: Spur 1, Sink-Blatt; Spur 2, Source-Blatt; Spur 3, Blütenknospe;
Spur 4, Internodien; Spur 5, Nodien; Spur 6, Cortex; Spur 7, Wurzel;
Spur 8, geöffnete Blüte

Abbildung 5

Aufbau der Transketolase cDNA-enthaltenden Plasmide



l-MCS: Linke Polylinkersequenz

SacI ----- SacII ----- NotI ----- XbaI ----- SphI ----- BamHI ----- SmaI ----- PstI ----- EcoRI ----- NotI
 5' - GAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGCTGCAGGAATTGGCGGCCGC-3'

r-MCS: Rechte Polylinkersequenz

NotI ----- EcoRI ----- EcoRV ----- HindIII ----- ^{Sall}
 HincII ----- XbaI ----- KpnI
 5' - GCGGCCGCGAATTGATATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACC -3'

Abbildung 6

**Konstruktion pflanzlicher Expressionskassetten zur Antisense-Inhibierung
der plastidären Transketolase**

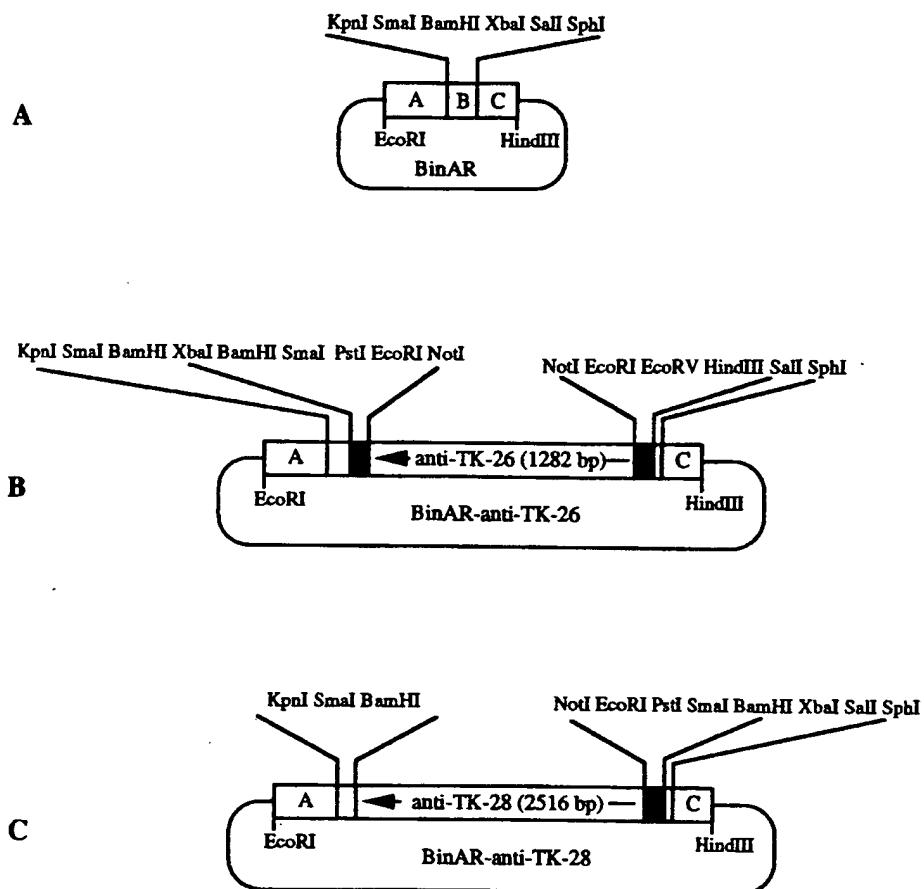
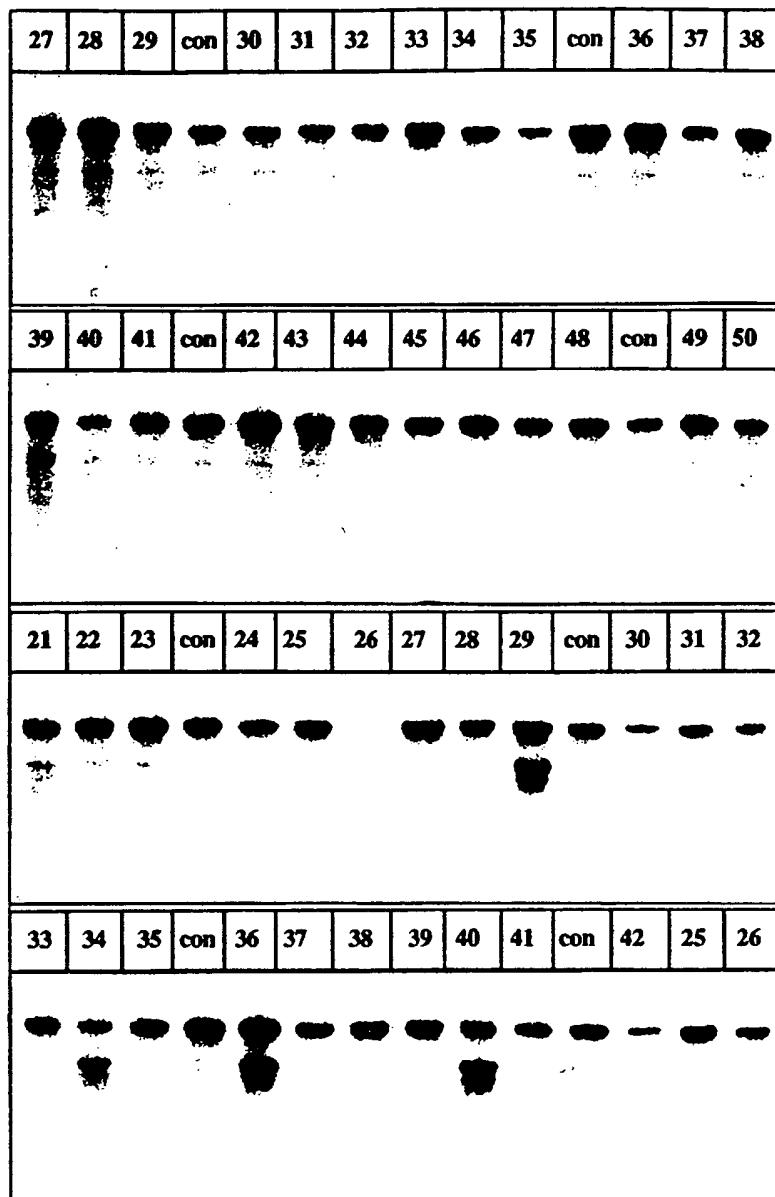


Abbildung 7

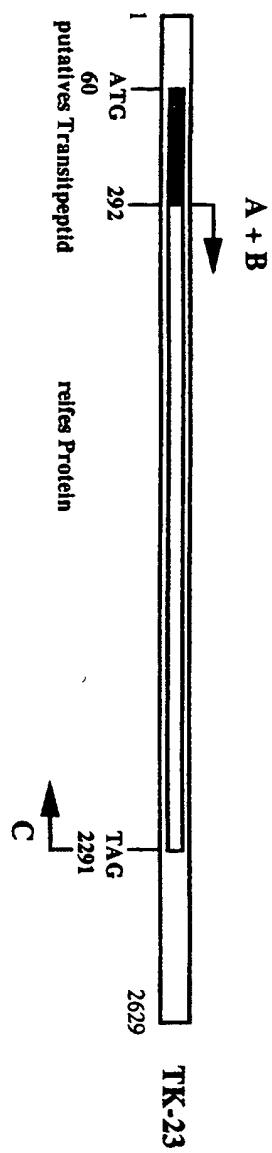
**Antisense Inhibierung der plastidären Transketolase in transgenen Tabakpflanzen:
RNA-Analyse der Transformanden in Gewebekultur**



Legende: Nummern, Bezeichnung der einzelnen unabhängigen Transformanden; con, untransformierte Kontrolle; A und B, Antisense-Konstrukt TK-28; C und D, Antisense-Konstrukt TK-26

Abbildung 8

PCR-Amplifikation der plastidären Transketolase



PCR-Primer:

A: 5'- AA GTC GAC GAA TTC AAA ATC GAG ACT GCG CTT GTT GAC -3'
 Sall EcoRI TK reifes Protein
38mer

B: 5'- AA GAA TTC ATG CAT CAT CAT CAT CAT AAA ATC GAG ACT GCG CTT GTT GAC -3'
 EcoRI Met 6 x His TK reifes Protein
53mer

C: 5'- TT GTC GAC GAA TTC CTA AGA AAC TTG TTT AGC TGC AGC -3'
 Sall EcoRI Stop
38mer

Abbildung 9

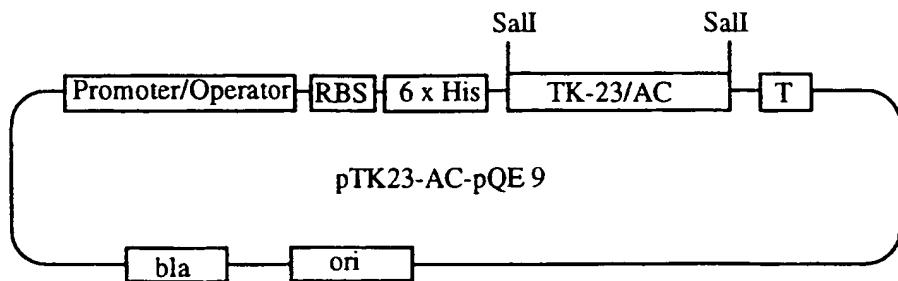


Abbildung 10

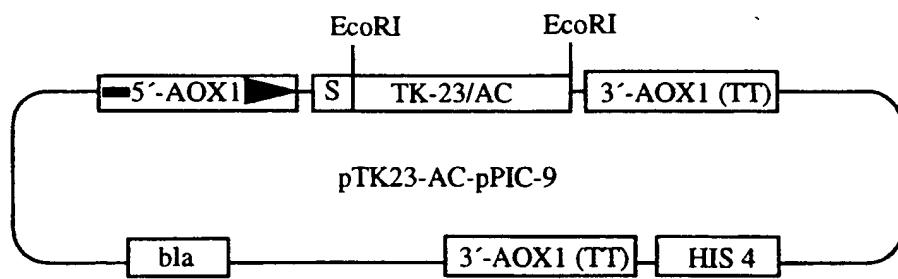


Abbildung 11

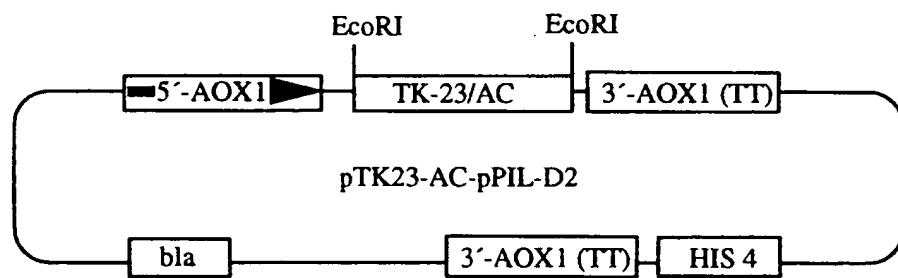


Abbildung 12

Expression der plastidären Transketolase in *E. coli* Zellen

Bakterienkultur	Kontrolle	TK-Antisense	TK-Sense
IPTG	+	-	+

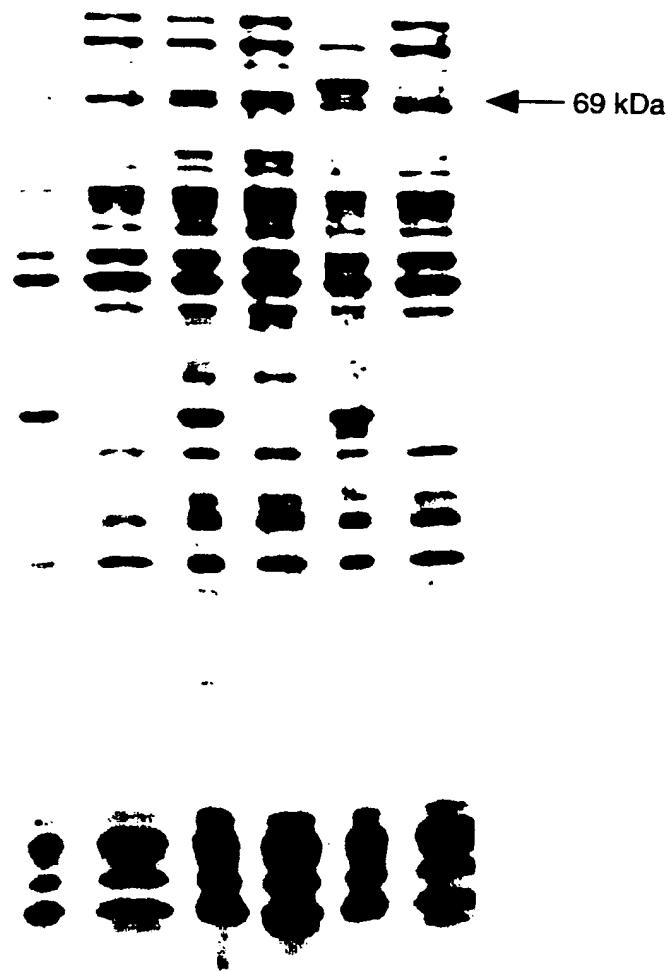


Abbildung 13